

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG
VON O-(β -HYDROXYÄTHYL)-RUTOSIDEN:
ERYTHROCYTEN ALS MODELL FÜR
MEMBRANWIRKUNGEN**

Benjamin Becker

1482

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Forth

UNTERSUCHUNGEN

ZUR WIRKUNG VON O-(β -HYDROXYÄTHYL)-RUTOSIDEN:

ERYTHROCYTEN ALS MODELL FÜR MEMBRANWIRKUNGEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Benjamin Becker

aus

Wiesbaden

1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. Wolfgang Felix

Mitberichterstatter: Prof. Dr.med. Wolfgang Forth

Dekan: Prof. Dr.med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1. 7. 1982



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Experimenteller Teil	4
1. Untersuchungen zur Bindung von Chlorpromazin an Erythrocyten und Beeinflussung durch HR	4
1.1 Geräte und Materialien	4
1.2 Versuchsablauf	4
2. Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen HR und Hämolsinen	4
2.1 Geräte und Materialien	4
2.2 Vorbereitung der Säulen	5
2.3 Konzentrationen	5
2.4 Auftragen der Proben	5
2.5 Messen	6
3. Untersuchungen zur Identifizierung der HR-Membranbindungsstellen	6
3.1 Geräte und Materialien	6
3.2 Versuchsablauf	6
3.3 SDS-Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese	9
4. Untersuchungen zum Hämolysechutz durch HR bei verschiedenen Tierspecies	10
4.1 Tiere	10
4.2 Versuchsablauf	10
C. Ergebnisse und Diskussion	11
1. Bindung von Chlorpromazin an Erythrocyten und Beeinflussung durch HR	11
2. Komplexbildung zwischen HR und Hämolsinen	12
3. Identifizierung von Membranbindungsstellen des HR	18
4. Hämolysechutz durch HR bei verschiedenen Tierspecies	25
Zusammenfassung	27
Literaturverzeichnis	28

A. EINLEITUNG

Flavonoide sind Naturstoffe, die im Pflanzenreich weit verbreitet und dort für das breite Farbenspektrum mitbestimmend sind. Schon 1936 berichtete Szent-Györgyi über die antiphlogistische Wirkung der Flavone, und somit wurde die Aufmerksamkeit auf die kurativen Wirkungen der Flavonoide, besonders des Rutins, gelenkt. Rutin enthält vier Hydroxylgruppen an den beiden aromatischen Ringen. Am mittleren Ring sind Zucker mit dem Grundskelet verknüpft. Rutin ist jedoch, wie die meisten Flavonoide, schlecht wasserlöslich. Durch Umsetzung mit Äthylenoxid oder Äthylenchlorhydrin entstehen die wasserlöslichen O-(β -Hydroxyäthyl)-Rutoside (Abb. 1), die sich in der Therapie durchgesetzt haben (11). Sie werden angewandt bei venösen Abflußstörungen und Ödemen.

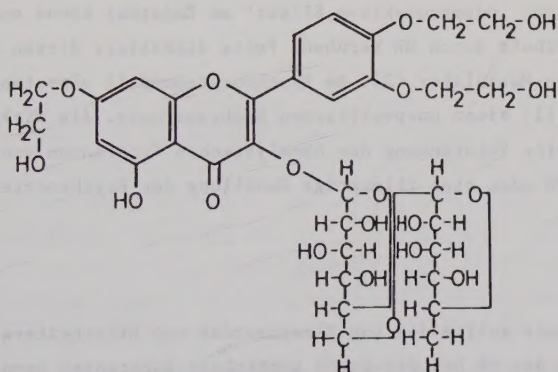


Abb. 1 : Strukturformel von 3',4',7',tri-O-(β -hydroxyäthyl)rutosid, dem Hauptbestandteil von HR (60 - 65%). Der restliche Anteil besteht aus mono-, di- und tetrahydroxyäthyl-substituierten Rutosiden.

Das Handelspräparat Venoruton^(R) (Zyma GmbH), das schon seit Jahren im Handel ist, enthält als Wirkstoff O-(β -Hydroxyäthyl)-Rutoside, abgekürzt α R. HR ist ein Gemisch aus mono-, di-, tri- und tetrahydroxyäthyliertem Rutin, bei dem die dreifach äthylierte Form mit 60 - 65% überwiegt. Bis jetzt ist noch nicht geklärt, ob sich die vier Komponenten in ihrer Wirksamkeit unterscheiden. HR besitzt einen Schutzeffekt gegen die Wirkung von ödemerzeugenden Substanzen.

Bei HR-Gabe kommt es in vivo im Tierversuch zu einem „ödemprotektiven Effekt“, das heißt, die Stärke der Ödemerzeugung durch endothelschädigende Substanzen ist herabgesetzt. Gábor hat durch HR-Gabe vor der Erzeugung von Ödemen eine signifikante Ödemhemmung festgestellt (4). Nach Versuchen mit HR am Hinterlauf der Katze berichtete Felix, daß bei vorheriger HR-Gabe ödemerzeugende Substanzen in ihrer Wirkung gehemmt werden (2). Biesendorfer und Mitarbeiter (1) untersuchten in vitro am Modell der Erythrocytenmembran, ob HR vor einer Membranschädigung durch verschiedene Hämolsine schützt, und stellten fest, daß verschiedene positiv geladene, negativ geladene oder neutrale Detergentien sowie Saponine und Phenothiazine in ihrer hämolytischen Wirkung durch HR abgeschwächt werden (1). Nach Hinzufügen von HR muß die Hämolsinkonzentration erhöht werden, um eine entsprechende Hämolyse in vitro zu erzeugen.

Die Pharmakodynamik des HR ist noch nicht eindeutig geklärt. Felix (2, 3) und Hammersen (6) erwägen, der „ödemprotektive Effekt“ am Endothel könne auf einem unspezifischen Membranschutz durch HR beruhen. Felix diskutiert diesen Mechanismus auch bei der glatten Muskulatur (3). Am Erythrocytenmodell vermuten Biesendorfer und Mitarbeiter (1) einen unspezifischen Membranschutz. Als Wirkungsmechanismus wird u.a. eine Verdrängung der hämolytischen Substanzen von ihren Bindungsstellen durch HR oder eine filmartige Umhüllung der Erythrocyten durch HR diskutiert (1).

Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die von Biesendorfer und Mitarbeitern (1) gefundene Schutzwirkung des HR bei der durch amphiphile Substanzen verursachten Hämolyse näher untersucht werden. Dazu sollten folgende Fragen geklärt werden:

- 1) Die hämolytische Wirkung der amphiphilen Substanzen ist von einer Bindung an die Zellen begleitet (9). Die Frage war daher, ob HR diese Bindung zu reduzieren vermag.
- 2) Der Mechanismus der Schutzwirkung kann entweder auf einer direkten Wechselwirkung des HR mit der entsprechenden hämolytisch wirkenden Substanz (chemischer Antagonismus) oder auf einem Schutz der Membran des Erythrocyten durch Besetzen der Wirkorte der hämolytischen Substanzen beruhen. Folgende zwei Fragestellungen sollten in diesem Zusammenhang bearbeitet werden:

- a. Welche Rolle spielen hydrophobe Wechselwirkungen (Aggregatbildung) zwischen HR und dem Hämolsin für den beobachteten Schutz vor Hämolyse?
 - b. Sind die Glykoproteine an der Membranaußenseite die „Bindungsstellen“ für HR?
- 3) Im Hinblick auf die Bewertung von Tierversuchen ist es wichtig, bei der Wirkung von Pharmaka Speciesunterschiede festzustellen. Es sollte daher untersucht werden, ob Ratten bzw. Hundeerythrocyten in vitro durch HR in ähnlicher Weise wie menschliche Erythrocyten gegen die durch Detergentien bewirkte Hämolyse geschützt werden.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Untersuchungen zur Bindung von Chlorpromazin an Erythrocyten und Beeinflussung durch HR

1.1 Geräte und Materialien

^3H -markiertes Chlorpromazin (spez. Aktivität 21 Ci / mmol) von NEN, Boston, Mass., USA.

HR von Zyma, München.

Beckmann-Mikrofuge.

Szintillationsflüssigkeit nach Bray (s. Kap. 2).

1.2 Versuchsablauf

Menschliches Vollblut wurde vom Plasma abzentrifugiert, und die Erythrocyten wurden dreimal mit PBS pH 7.4 gewaschen. Jeweils 30 μl der abzentrifugierten Erythrocyten wurden mit 970 μl PBS-Puffer, der verschiedene Konzentrationen HR (10^{-2}M , 10^{-3}M , 10^{-4}M , 10^{-5}M) enthielt, und mit 7 μl einer 10 mM ^3H Chlorpromazinelösung (spez. Aktivität 8 μCi / mmol) versetzt. Die einzelnen Versuchsansätze wurden 15 Minuten bei 37°C inkubiert und dann in einer Beckmann-Mikrofuge 10 Minuten zentrifugiert. Von der gesamten Inkubationslösung und vom Überstand nach Zentrifugation wurden jeweils 10 μl entnommen und nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit die Radioaktivität bestimmt.

2. Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen HR und Hämolysinen

2.1 Geräte und Materialien

Sephadex Gel G-25 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden).
Biogel P2 (BioRad).

Dextranblau (MG = 2×10^6 ; E. Merck, Darmstadt, BRD).

Szintillationsflüssigkeit (Bray's solution: 4 l Dioxan, 1 g POPOP, 50 ml Methanol, 20 g PPO, 300 g Naphthalin, 100 ml Äthylenglykol werden mit Dioxan zu 5 l aufgefüllt).

^3H -markiertes Chlorpromazin (spez. Aktivität 21 Ci / mmol, New England Nuclear, Boston, Mass., USA).

^3H -markierte Deoxycholsäure (4 Ci / mmol).

Säulenrohr (Länge 75 cm, Durchmesser 17 mm).

LKB-Fraktionssammler (LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden).

HR (Zyma, München, BRD).

2.2 Vorbereitung der Säulen

Die Gele (Sephadex G 25 bzw. Biogel P 2) wurden mit einem Überschuß von Aqua dest. versetzt und zur Quellung in ein siedendes Wasserbad gesetzt (ca. 1 Stunde). Nach Ablauf der Abkühlzeit wurde die Gelsuspension in die Säule gefüllt. Das überschüssige Wasser wurde durch den Auslaufschlauch abgelassen und das Gel entsprechend hinzugegeben. Die Höhe des Gelbettes betrug 70 cm. Das Gel wurde nun mit der entsprechenden HR-Lösung in PBS-Puffer, pH = 7.4, äquilibriert. Nach der Äquilibration wurde das Ausschlußvolumen mit Dextranblau bestimmt. (Die großen Dextranmoleküle treten nicht in die Gelporen ein und laufen mit der Lösungsmittelfront durch das Gel.)

2.3 Konzentrationen

Die Konzentrationen der Detergentien wurden nach ihrer hämolytischen Potenz gewählt, d.h. 0.3 mM Chlorpromazin und 0.6 mM Natrium-Deoxycholsäure. Die Detergentien wurden in HR-Lösungen in PBS-Puffer (pH 7.4) in verschiedenen Konzentrationen (siehe die entsprechenden Abbildungen) und mit jeweils 10 μl (auf 2 ml) radioaktiver Substanz versetzt.

2.4 Auftragen der Proben

Durch Öffnen des Auslaufes läßt man die überstehende Flüssigkeit bis an die Grenze der Gelfüllung einziehen. Das Detergens (Chlorpromazin oder Deoxycholsäure), in 2 ml der HR-Lösung gelöst, wurde mit der Pasteurpipette gleichmäßig

aufgetragen, ohne daß das Gel aufgewirbelt wurde. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Säule wurde dann mit dem Äquilibrierungspuffer eluiert und mit Hilfe eines Fraktionssammlers in einzelne Fraktionen unterteilt.

2.5 Messen

100 µl jeder Fraktion wurden in Plastikfläschchen gegeben, mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Packard Liquid Scintillation Spektrometer die Radioaktivität bestimmt.

3. Untersuchungen zur Identifizierung der HR-Membranbindungsstellen

3.1 Geräte und Materialien

Wasserbad mit Thermostat.

Beckman-Mikrofuge (Beckman Instruments, Palo Alto, Calif., USA).

Trypsin (Serva Fine biochemica, Heidelberg, BRD).

Trypsininhibitor (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA).

Chlorpromazin (Serva Fine biochemica, Heidelberg, BRD).

Aescin (Madaus AG, Köln, BRD).

HR (Zyma, München, BRD).

Zeiss-Spektralphotometer PMQ 3 (Zeiss, Oberkochen, BRD).

Apparat für die SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese (Eigenanfertigung).

3.2 Versuchsablauf

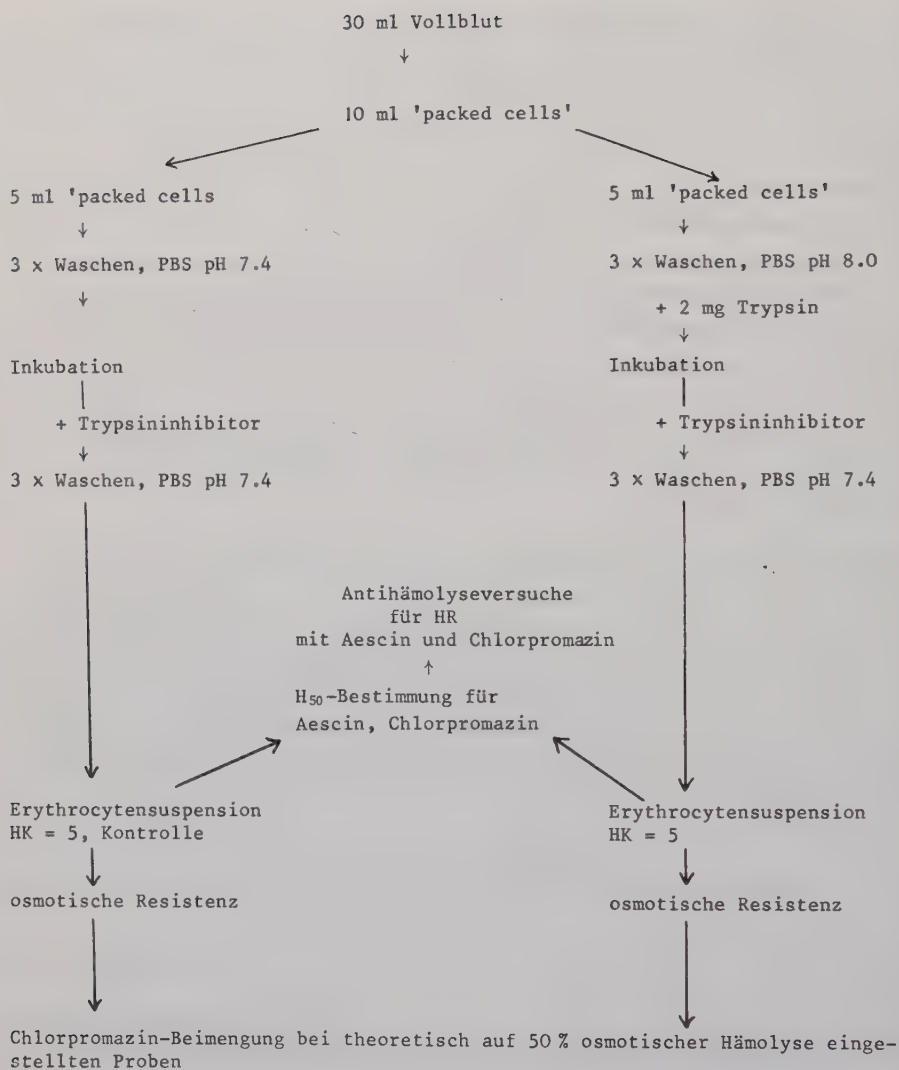
Herstellung der Suspensionen:

30 ml Vollblut wurden zentrifugiert und vom Plasma bereit. Jeweils 5 ml Erythrocytenkonzentrat wurden in PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) mit pH 8 und in PBS-Puffer mit pH 7.4 gewaschen. Die Probe im PBS pH 7.4 diente als Kontrolle. Das Waschen wurde für jede Probe mit dem entsprechenden

Puffer zweimal wiederholt. Die Probe, die mit PBS pH 8 gewaschen worden war, wurde anschließend 1 : 1 mit dem Puffer verdünnt. Danach wurde mit 2 mg Trypsin für 1 Stunde im Wasserbad bei 37°C bei Rotieren inkubiert. Die Kontrolle (ohne Trypsin) wurde 1 : 1 mit PBS pH 7.4 verdünnt und analog behandelt. Nach der Inkubation wurde jeweils 1 mg Inhibitor zu den beiden Proben hinzugegeben. Die Proben wurden 10 Minuten lang leicht bewegt und dann zentrifugiert. Das Erythrocytenkonzentrat beider Proben wurde mit PBS pH 7.4 je dreimal gewaschen. Aus beiden gewaschenen Konzentraten wurden Erythrocytensuspensionen mit Hämatokrit 5 hergestellt (0,5 ml Konzentrat + 9,5 ml Puffer PBS pH 7.4). Von diesen beiden Suspensionen wurden 66 µl jeweils auf 1 ml Reaktionsvolumen mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen gegeben. Der Endhämatokrit betrug somit 0,3. Die Inkubationszeit betrug immer 30 min, danach wurde in der Beckman-Microfuge 5 min abzentrifugiert und der Überstand anschließend im Spektralphotometer bei 540 nm gemessen. Die Werte wurden auf 100 % Hämolyse, erhalten in Aqua dest., bezogen.

Die einzelnen Versuche sind im folgenden Schema zusammengefaßt (S. 8).

Die Trypsinspaltung an der Erythrocytenmembran wurde mit der SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese kontrolliert. Dazu wurden die trypsinvorbehandelten Erythrocyten und die Kontrolle jeweils zweimal mit PBS-Puffer pH 7.4 und danach einmal mit Arbeitspuffer (100 mM Tris, 0,37 g%, NaCl, pH = 7) gewaschen. Die Hämolyse erfolgte in Eis mit 5 mM Phosphatpuffer, pH = 8 (Konzentrat/Puffer $\approx 1/40$). Danach wurde dreimal bei 18 000 rpm zentrifugiert, wobei zur Entfernung des HR die ghosts jeweils mit 5 mM Phosphatpuffer nachgewaschen wurden.



3.3 SDS-Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese

3.3.1 Aufbereitung der Proben

Die Ghosts wurden in einem Puffer, der 0,0625 M Tris, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerol und 5 % 2-Mercaptoäthanol enthielt, solubilisiert. Die Lösung wurde 2 min auf dem Wasserbad gekocht und zentrifugiert.

3.3.2 Gel-Herstellung

Die Polyakrylamidgele wurden nach Laemmli (7) hergestellt. Das Trenngel hatte eine Polyakrylamid-Konzentration von 8 %. Eine entsprechende Menge Polyakrylamid wurde aus einer Stammlösung, die 0,8 N,N'-Bis-Methylenakrylamid, 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8, und 0,1 % SDS enthielt, entnommen. Es wurden 0,025 % Tetramethyläthylendiamin (Temed) hinzugesetzt und mit Ammoniumpersulfat (0,025 %) die Polymerisation gestartet.

Das Sammelgel enthielt 5 % Polyakrylamid, 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,025 % Temed und 0,025 % Ammoniumpersulfat.

3.3.3 Elektrophorese

20 µg Protein jeder Probe in 20 µl Lösung wurden auf das Gel aufgetragen.

Der Elektrophoresepuffer enthielt: 0,025 M Tris; 0,192 M Glycin, pH 8,3; 0,1 % SDS. Das Gel wurde 3 h mit 30 - 35 mM / Gel bei 4°C laufen gelassen. Die Gele wurden mit einer wässrigen Lösung von 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure 30 min fixiert.

3.3.4 Färben und Entfärben

Die Färbelösung enthielt 0,01 % Coomassie Blue, 25 % Methanol und 10 % Essigsäure (30 min).

Glykophorin wurde nachgewiesen durch Behandlung eines Gels mit Perjodsäure und anschließend mit dem Schiffreagens. Diese Färbung ist spezifisch für Kohlehydrat enthaltende Proteine.

Anschließend wurden die Gele mehrmals mit einer wässrigen Lösung von Methanol (5 %) und 7 % Essigsäure entfärbt.

4. Untersuchungen zum Hämolysechutz durch HR bei verschiedenen Tierspecies

4.1 *Tiere*

Weibliche Beagle-Hunde.

Weibliche Spreague-Dawley-Ratten.

4.2 *Versuchsablauf*

Das den Tieren entnommene Blut wurde in gleicher Weise behandelt, wie in Kap. 3 beschrieben. Mit den so erhaltenen Erythrocyten wurden die Untersuchungen zur Hämolyse, zum Schutz vor Hämolyse durch HR sowie zur Trypsinspaltung so, wie in Kap. 3 beschrieben, durchgeführt.

C. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Bindung von Chlorpromazin an Erythrocyten und Beeinflussung durch HR

Die Bindung von amphiphilen Substanzen an Erythrocyten und deren Membrane wurde von Seeman (10) untersucht. Zentrifugieren von Erythrocyten, die in der Lösung einer amphiphilen Substanz vorinkubiert worden waren, resultierte in einer Verminderung der Substanzkonzentration im Überstand und in einer Zunahme der mit den Erythrocyten assoziierten Menge. Wurden nun Erythrocyten mit einer Lösung von tritiiertem Chlorpromazin und HR inkubiert und wurde dann nach Zentrifugation im Überstand die Radioaktivität gemessen, so war die Bindung im Vergleich zu einer Kontrolle ohne HR deutlich vermindert (Abb. 2).

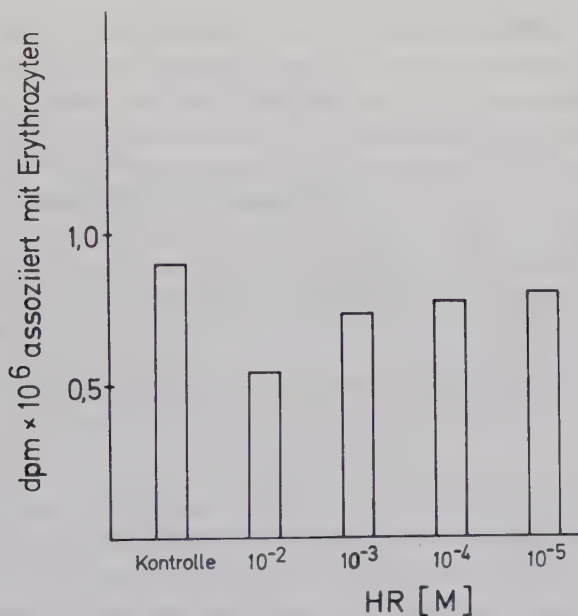


Abb. 2: Bindung von radioaktiv markiertem Chlorpromazin ($1,5 \times 10^{-4}$ M, spez. Aktivität $8 \mu\text{Ci} / \text{mmol}$) an menschliche Erythrocyten ($\text{HK} = 3$) bei verschiedenen HR-Konzentrationen (s. B, experim. Teil).

Die geringste Menge Chlorpromazin wurde bei einer HR-Konzentration von 10^{-2} M gebunden, einer Konzentration, bei der auch der antihämolytische Effekt des HR am stärksten ausgeprägt war (1).

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, daß HR die Bindung der amphiphilen Substanz an die Erythrocyten einschränkt. Da kein radioaktives HR zur Verfügung stand, konnte nicht untersucht werden, ob HR an Stelle der amphiphilen Substanz von den Zellen gebunden wird.

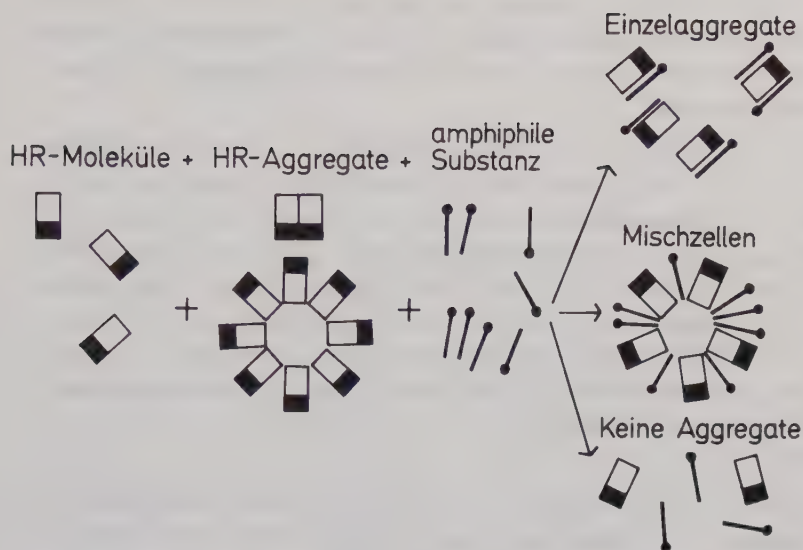
Es bleiben daher zwei Möglichkeiten für die Erklärung dieses Effekts:

- 1) Verdrängung des Chlorpromazins von den Membranbindungsstellen durch HR.
- 2) Reduzierung des freien Chlorpromazins in Lösung durch Aggregatbildung zwischen Chlorpromazin und HR (chemischer Antagonismus).

2. Komplexbildung zwischen HR und Hämolysinen

Als Ursache für den durch HR bewirkten Schutz gegen Hämolyse kommt ein sogenannter chemischer Antagonismus in Frage. Chemischer Antagonismus bedeutet die Inaktivierung von Wirkstoffen durch eine oder mehrere fremde Substanzen (Antagonisten), ehe der Wirkort erreicht wird. Auf Grund der Verschiedenartigkeit der verwendeten oberflächenaktiven Substanzen ist eine *hydrophobe Bindung* der Hämolysine an HR denkbar. Da alle angewandten Verbindungen zur Aggregatbildung (Mizellen) befähigt sind, besteht die Möglichkeit, daß durch hydrophobe Wechselwirkungen sogenannte Mischmizellen gebildet werden. Durch diese Art der Bindung könnten die Detergensmoleküle inaktiviert werden.

Eine schematische Darstellung wird auf der nächsten Seite (S. 13) gezeigt.



Schematische Darstellung:

Reaktion von HR mit Hämolysinen durch hydrophobe Wechselwirkungen

Die Bildung von Mischmizellen mit HR wurde für die Hämolysine Chlorpromazin und Natriumdeoxycholat untersucht. HR-Moleküle bilden bei Konzentrationen ab 10^{-3} M Aggregate (Mizellen). Zu einer Lösung von HR in einer Konzentration, bei der Mizellenbildung vorgefunden wurde (8), wurde radioaktiv markiertes Chlorpromazin bzw. Natriumdeoxycholat gegeben. Mit Hilfe der Gelfiltration wurde untersucht, ob Chlorpromazin zusammen mit HR Mischmizellen bildet oder ob es in Form von einzelnen Molekülen vorliegt.

Die Gelfiltration ist ein Trennverfahren für Moleküle verschiedener Größe. Moleküle, die größer als die Poren im Gel sind, laufen schneller durch die Säule, werden also zuerst eluiert. Kleine Moleküle dagegen bleiben, entsprechend ihrer Form und relativen Größe, unterschiedlich lange in den Poren.

Die kleinsten Moleküle werden somit zuletzt eluiert. Mischmizellen würden eher den großen Molekülen entsprechen und daher schnell eluiert werden. Optimal für diese Trennung ist ein Gel, dessen Ausschußgrenze unterhalb der Mischmizellengröße liegt, so daß die Mischmizellen nie in die Poren eindringen können.

Bei der Bildung von Mizellen bzw. Mischmizellen liegt immer ein Teil der amphiphilen Substanz in Form von Einzelmolekülen vor. Diese Dissoziation unterliegt dem Massenwirkungsgesetz, das heißt, eine Auftrennung nach Molekülgröße, wie sie in der Gelchromatographie durchgeführt wird, hätte zur Wiederherstellung des Dissoziationsgleichgewichtes eine ständige Neubildung von Einzelmolekülen aus den Mizellen zur Folge. Die Auswirkung dieses Effektes wäre eine Peakverbreiterung des Mizellenpeaks, im Extremfall ein „Schmieren“ über die ganze Säule. Damit dies vermieden werden konnte, wurde die Auftrennung in einer mit HR äquilibrierten Säule durchgeführt.

Die ersten Versuche wurden mit einer Sephadex-G-25-Säule durchgeführt (Abb. 3). Mit Ausnahme eines kleinen Peaks, der vermutlich auf eine Verunreinigung des Chlorpromazins mit polymeren Produkten zurückzuführen ist, wurde die Hauptmenge des Chlorpromazins am Ende des Trennvolumens gefunden. Dies bedeutet, daß eventuelle Mischmizellen oder Aggregate kleiner als 25 000 Dalton sein müssen.

Die Versuche wurden nun wiederholt mit einer Säule, gefüllt mit Biogel P2. Dieses Säulenmaterial basiert auf einer Polyakrylamidverbindung und besitzt einen Fraktionierungsbereich von 100 - 1800 Daltons. Abb. 4 zeigt das chromatographische Verhalten einer $100\text{ }\mu\text{M}$ ^3H -Chlorpromazin-Lösung bei verschiedenen HR-Konzentrationen. Die Hauptmenge des Chlorpromazins wurde bei höheren HR-Konzentrationen schneller eluiert als bei niederen HR-Konzentrationen. Dies deutet darauf hin, daß bei höheren HR-Konzentrationen die Bildung von Aggregaten zunimmt.

Diese Peakverschiebungen treten im Konzentrationsbereich auf, in dem HR anti-hämolytisch wirkt. Nach Biesendorfer et al. (1) setzt die antihämolytische Wirkung bei etwa 10^{-4} M HR ein und erreicht ein Maximum bei 5×10^{-2} M.

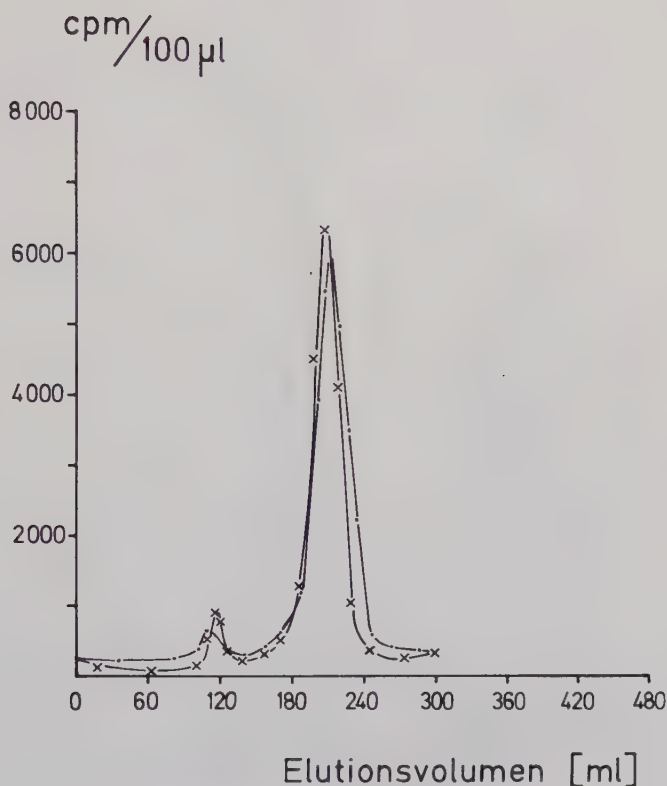


Abb. 3 : Gelchromatographische Auftrennung (Sephadex G-10) von radioaktiv markiertem Chlorpromazin in isotoner HR-Lösung, pH = 7.4. Auftragsvolumen jeweils 2 ml; Säulendimensionen: Länge 75 cm, Ø 17 mm. Das Ausschlußvolumen beträgt 60 ml.

●—○ = + 20 µCi radioaktives Chlorpromazin (spez. Akt. 21 Ci / mmol) in $1,5 \times 10^{-3}$ M Chlorpromazin und 5×10^{-3} M HR-Lösung.

x x x = + 20 µCi radioaktives Chlorpromazin in $1,5 \times 10^{-3}$ M Chlorpromazin und 10^{-2} M HR-Lösung,

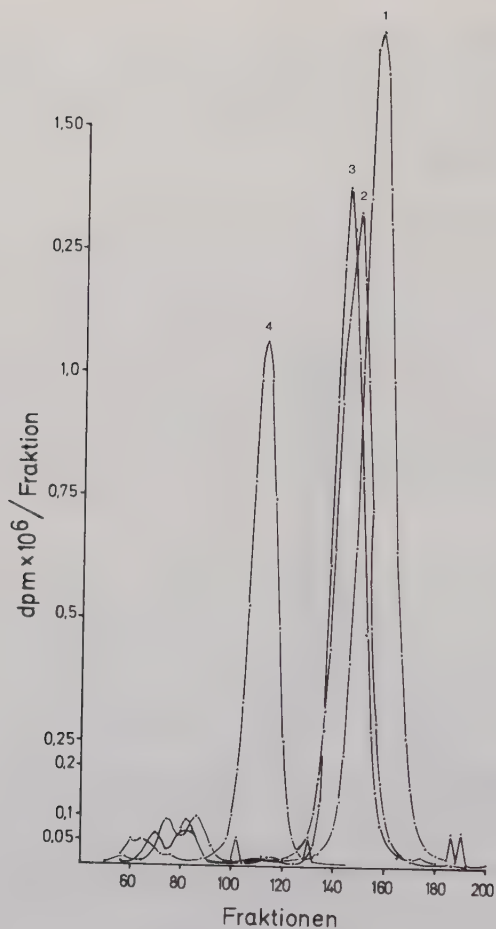


Abb. 4 : Gelchromatographische Auftrennung (Biogel P2) von radioaktiv markiertem Chlorpromazin (0.3 mM, spez.Akt. 16 Ci / M) bei verschiedenen HR-Konzentrationen (Versuchsbedingungen wie in Abb. 3).
1 = ohne HR, 2 = 5×10^{-5} M HR, 3 = 5×10^{-4} M HR, 4 = 5×10^{-3} M HR.

Zur Sicherstellung, daß es sich bei dem beobachteten Effekt nicht um eine spezifische Chlorpromazineigenschaft handelt, wurden ähnliche Versuche mit radioaktiv markiertem Natriumdeoxycholat, einer amphiphilen Substanz mit Steroidgrundgerüst, durchgeführt (Abb. 5). Die antihämolytische Wirkung des HR beginnt bei dieser Verbindung bei 10^{-3} M HR. Steigende HR-Konzentrationen bewirken auch hier eine Peakverschiebung in Richtung höherer Molekulargewichte.

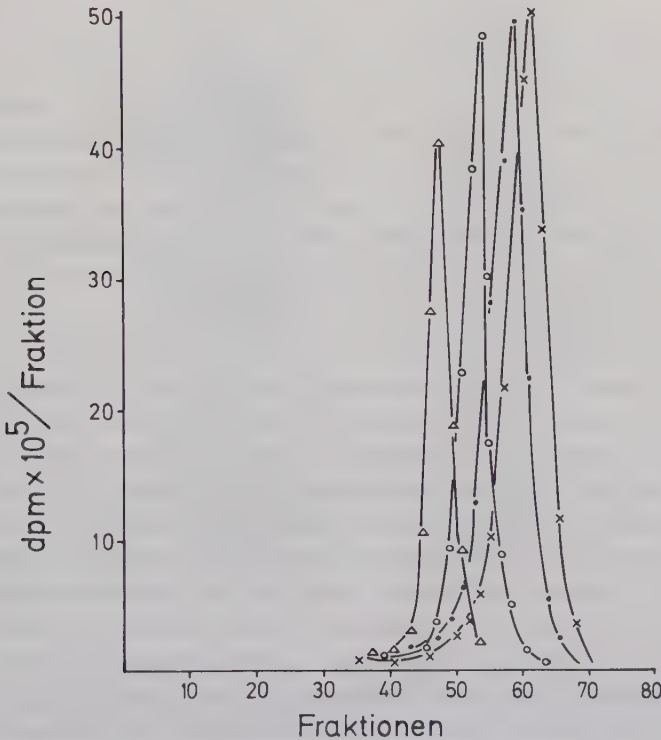


Abb. 5: Gelchromatographische Auftrennung (Biogel P2) von radioaktiv markiertem Natriumdeoxycholat (0,6 mM, spez. Akt. 8.3 Ci / M) bei verschiedenen HR-Konzentrationen (Versuchsbedingungen wie in Abb. 3).
x—x = ohne HR, •—• = 10^{-3} M HR, o—o = 5×10^{-3} M HR, Δ — Δ = 10^{-2} M HR

Diese beiden Versuche zeigen deutlich, daß sich bei den HR-Konzentrationen, die antihämolytische Wirkungen besitzen, Aggregate bilden. Dies würde bedeuten, daß die freie Konzentration der amphiphilen Substanz so weit vermindert wird, daß sie nicht mehr ausreicht, um Hämolyse zu bewirken.

Die Unterschiede im Elutionsverhalten zwischen Chlorpromazin und Natrium-deoxycholat (unterschiedliche Positionen der Peaks) sind vermutlich auf die unterschiedlichen Aggregatsgrößen zurückzuführen.

3. Identifizierung von Membranbindungsstellen des HR

Die Erythrocytenmembran enthält Proteine mit Kohlehydratketten, sogenannte Glykoproteine. Das bedeutendste dieser Glykoproteine ist das Glykophorin. Es ist ein Transmembranprotein mit den Zuckeranteilen an der Membranaußenseite und hat Bedeutung für Lektinbindung (zur Bestimmung von Blutgruppen) und antigene Eigenschaften. Glykophorin kann durch SDS-Polyakrylamidgелеlektrophorese aufgetrennt werden und wird durch Anfärben mit dem Perjodat-Schiff-Reagenz sichtbar gemacht (Abb. 6).

Die folgenden Überlegungen lagen den anschließend beschriebenen Untersuchungen zu Grunde. Wenn der Hämolysechutz durch HR auf einer Wechselwirkung mit der Erythrocytenmembran beruht, könnten die Glykoproteine, ähnlich der Lektinbindung, „Receptorstellen“ für HR sein. Wenn nun der Zuckeranteil, der eine mögliche Bindungsstelle sein könnte, abgespalten wird, sollten bei Zutreffen dieser Annahme die Hämolysechutz-Eigenschaften des HR verlorgenehen. Eine Abspaltung des Zuckeranteils ist möglich durch Behandlung der Erythrocyten mit Trypsin. Diese Protease spaltet Peptidketten bei Arginin und Lysin. Da die Oligosaccharide über Peptidketten, welche diese Aminosäuren enthalten, mit dem Protein verknüpft sind, kann durch Trypsinbehandlung der Zuckeranteil abgespalten werden. Durch Polyakrylamidgелеlektrophorese in SDS, einem Trennverfahren, bei dem Proteine analytisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, konnte die erfolgreiche Abspaltung der Zucker nachgewiesen werden (Abb. 6). Neben dem Glykophorin (Abb. 6 B) wird ein weiteres Membranprotein durch das proteolytische Enzym angegriffen (Abb. 6 A). Es handelt sich dabei um die Bande 3, ein Protein,

das sich ebenfalls durch die Membran erstreckt und mit einem kleinen Anteil nach außen ragt. Verschiedene Anzeichen deuten darauf hin, daß es sich bei der Bande 3 um den Anionentransporter handelt.

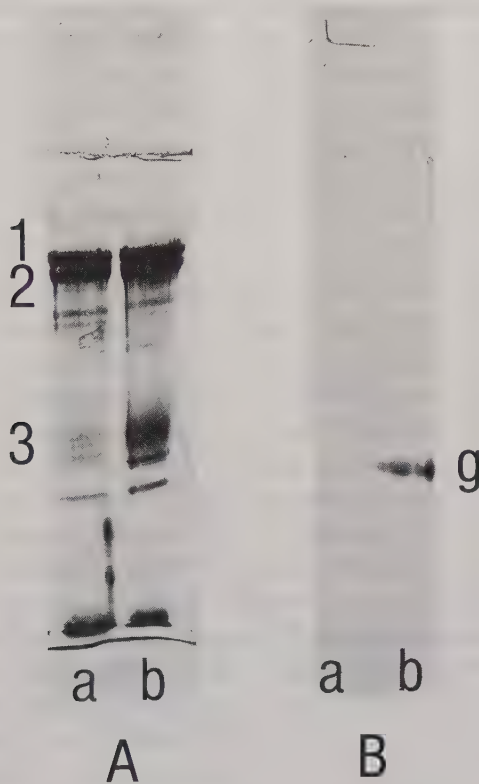


Abb. 6 : SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese (8 % Akrylamid) der Membrane von mit Trypsin behandelten Erythrocyten (s.a. Exp.Teil, 3.3).

- A = Gel, gefärbt mit Coomassie-Blue
a: mit Trypsin behandelte Erythrocyten
b: Kontrolle
(1,2: Spektrin; 3: Anionentransportprotein)
- B = Gel, gefärbt mit dem Schiffs-Reagenz nach Perjodat-Oxidation
a: mit Trypsin behandelte Erythrocyten
b: Kontrolle
(g: Glykophorin)

Als erstes wurde untersucht, ob die Trypsinbehandlung einen Einfluß auf die osmotisch bedingte Hämolyse hat. Abbildung 7 zeigt deutlich, daß die Kurve nicht signifikant verschoben ist. Daraus kann gefolgert werden, daß die Kohlehydratketten, welche die gesamte Membranaußenseite des Erythrocyten bedecken, für die osmotische Stabilität keine bedeutende Rolle spielen.

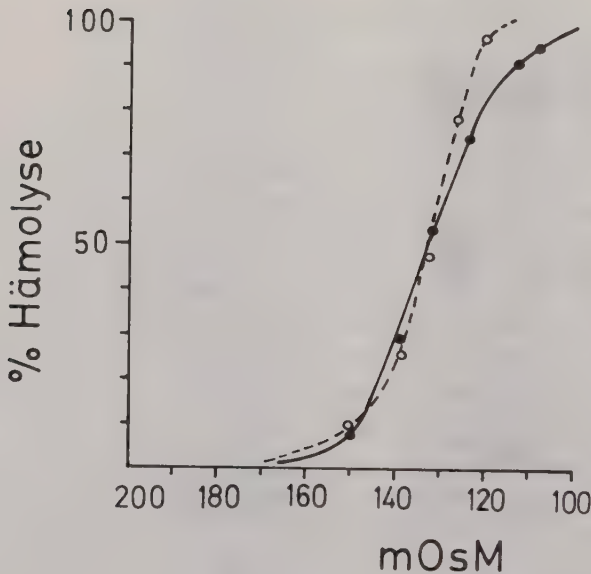


Abb. 7: Osmotische Hämolyse von (●—●) und nach (o----o) Trypsin-Behandlung der Erythrocyten (s.a. Exp. Teil 3)

Der Einfluß der Trypsinbehandlung auf die Hämolyse, bedingt durch amphiphile Verbindungen, wurde am Beispiel des Chlorpromazins untersucht. Aus Abbildung 8 wird ersichtlich, daß die Abspaltung der Zucker keine Auswirkung auf die hämolytischen Eigenschaften des Chlorpromazins hat. Diese Versuchsanordnung zeigt den „biphasischen Effekt“ der sogenannten spezifischen Hämolysine, zu denen Chlorpromazin gezählt wird. Unter biphasischem Effekt versteht man die Erscheinung, daß die spezifischen Lysine in niedriger Konzentration die Erythrocyten vor Hämolyse schützen, während bei höherer Konzentration Hämolyse erfolgt. Dieser Effekt wurde bei einer Erythrocytensuspension untersucht, die auf 50 % Hämolyse eingestellt worden war. Im Gegensatz dazu wird durch die sogenannten unspezifischen Hämolysine wie Aescin nur Hämolyse verursacht.

Der biphasische Effekt wird durch HR insgesamt zu niedrigeren Hämolysinkonzentrationen verschoben, wie in Abbildung 8 deutlich zu sehen ist. Werden die Erythrocyten vorher mit Trypsin behandelt, so ergibt sich eine geringfügige Verschiebung der Kurve, das heißt, trypsinbehandelte Erythrocyten sind etwas empfindlicher gegen Hämolysine. Bei diesem Versuch wurde eine HR-Konzentration benützt, die einen optimalen Schutz vor Hämolyse verleiht (2×10^{-2} M). Der durch HR bewirkte Hämolyseschutz ist dosisabhängig (1). Dies kann gezeigt werden, wenn der Einfluß steigender HR-Konzentrationen auf das Ausmaß der Hämolyse einer Erythrocytensuspension, die mit einem Hämolysin auf 50 % Hämolyse eingestellt worden ist, untersucht wird. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse, wenn Aescin oder Chlorpromazin als Hämolysin benutzt wird. Trypsinvorbehandelte Erythrocyten verhalten sich etwas unterschiedlich. Überraschenderweise kommt es dabei zu einer Verschiebung nach links, also zu niedrigeren HR-Konzentrationen. Die Zuckeranteile der Membranaußenseite scheinen als „Bindungsstellen“ für HR keine Rolle zu spielen. Die „Linksverschiebung“ der Kurven könnte so interpretiert werden, daß HR eine mögliche Schutzfunktion der Glykoproteine gegenüber den Hämolysinen übernimmt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Trypsinbehandlung den Hämolyseschutz von HR nicht beeinflußt. Der geringe Einfluß der Trypsinvorbehandlung auf osmotische Hämolyse sowie auf die durch Detergentien bewirkte Hämolyse deutet darauf hin, daß die Kohlehydratketten der Membranaußenseite keine wesentliche Rolle bei der Hämolyse spielen.

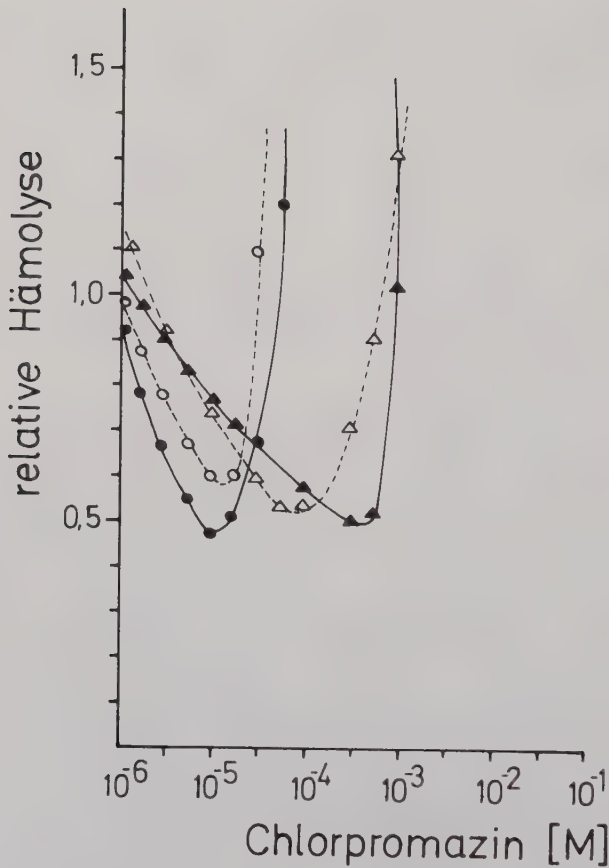


Abb. 8 : Hämolyseschutz durch Chlorpromazin von und nach Trypsinbehandlung und Effekt von 2×10^{-2} M HR.
Die Erythrocyten wurden in einer Lösung mit einer NaCl-Konzentration aufgenommen, die 50%ige Hämolysse bewirkte und steigende Konzentrationen Chlorpromazin enthielt.

- ▲—▲ = Kontrolle + HR
- = Kontrolle ohne HR
- Δ----Δ = Trypsinbehandelt + HR
- o----o = Trypsinbehandelt ohne HR

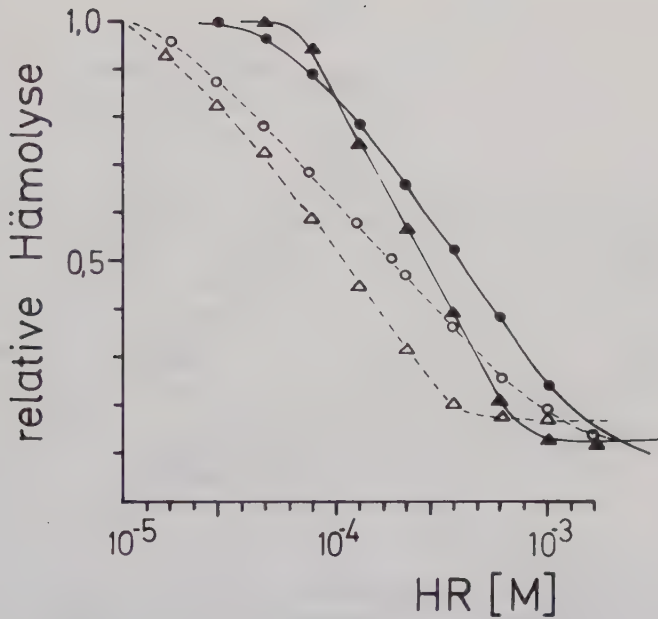


Abb. 9 : Antihämolyse durch HR bei Aescin- und Chlorpromazinkonzentrationen, die 50%ige Hämolyse bewirken (2×10^{-6} M Aescin und $2,7 \times 10^{-4}$ M Chlorpromazin) vor und nach Trypsinbehandlung.

- | | |
|---|--|
| ●—● = Aescin-Antihämolyse | ▲—▲ = Chlorpromazin-Antihämolyse |
| ○---○ = Aescin-Antihämolyse
nach Trypsinbehandlung | △---△ = Chlorpromazin-Antihämolyse
nach Trypsinbehandlung |

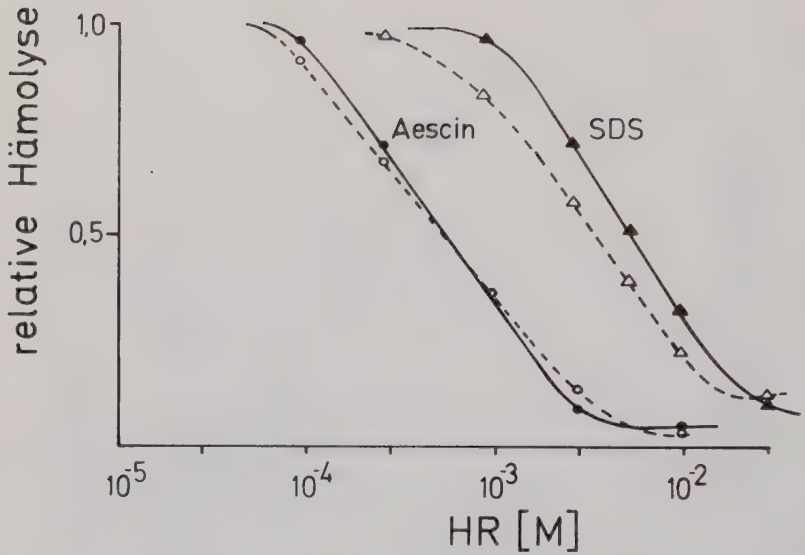


Abb. 10: Antihämolysekurven von Aescin und SDS bei Rattenerthrocyten. Die relative Hämolyse bei aufsteigenden HR-Konzentrationen nach einer Trypsinspaltung im Vergleich mit einer Kontrolle.

●—● = Aescin-Antihämolyse	▲—▲ = SDS-Antihämolyse
○---○ = Aescin-Antihämolyse nach Trypsinspaltung	△---△ = SDS-Antihämolyse nach Trypsinspaltung

4. Hämolysechutz durch HR bei verschiedenen Tierspecies

Unterschiede in der Arzneimittelwirkung bei verschiedenen Tierspecies sind ein bekanntes Phänomen. Ein typisches Beispiel ist die Unempfindlichkeit der Ratte gegenüber Herzglykosiden. Deshalb ist es von Bedeutung, Kenntnisse über Wirkungen von Pharmaka bei verschiedenen Tierspecies zu erarbeiten und diese miteinander zu vergleichen.

In In-vitro-Versuchen sollte festgestellt werden, ob Speciesunterschiede im Hämolyseverhalten gegenüber Detergentien existieren. Verwendet wurden Erythrocyten von Ratten und Hunden, deren Verhalten gegenüber Natriumdodecylsulfat und Aescin untersucht wurde. Ferner wurden die Erythrocyten mit Trypsin vorbehandelt und die Schutzwirkung von HR auf die Hämolyse untersucht (Abb. 10 und 11).

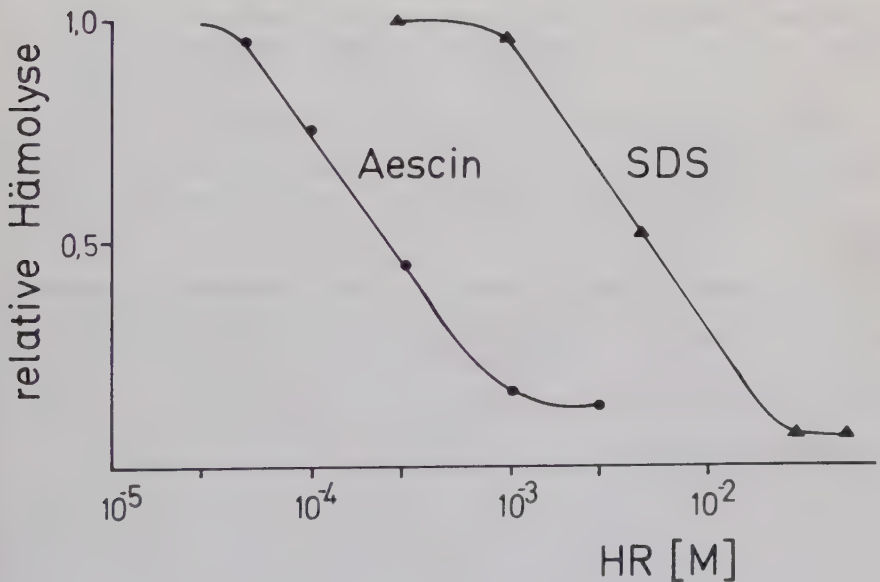


Abb. 11: Antihämolyssekurven von Aescin und SDS bei Hundeerythrocyten:
Die relative Hämolyse bei aufsteigenden HR-Konzentrationen

Tabelle 1 zeigt, daß die Werte für 50 % Hämolyse und für 50 % Antihämolyse durch HR bei Ratte und Hund ähnlich sind. Diese Werte entsprechen den Werten für Humanerythrocyten nach Biesendorfer et al. (1). Auch eine Trypsinspaltung bei Rattenerythrocyten bewirkte keine Verschiebung der Werte für 50 % Hämolyse durch Aescin und SDS (Tab. 1 und Abb. 10). Die Abbildungen 10 und 11 zeigen, daß die Schutzwirkung durch HR im gleichen Bereich wie bei menschlichen Erythrocyten auftritt.

Aufgrund der in Tabelle 1 und in den Abbildungen 10 und 11 dargestellten Ergebnisse kann also gesagt werden, daß hinsichtlich Hämolyse sowie Hämolyse-schutz durch HR bei den untersuchten Tierspecies keine Unterschiede bestehen.

Tab. 1: Hämolyse-schutz durch HR bei Human-, Ratten- und Hundeerythrocyten *

Erythrocyten Species	Hämolysin	50 % Hämolyse ohne Trypsin	50 % Hämolyse mit Trypsin	50 % Anti-hämolyse durch HR ohne Trypsin	50 % Anti-hämolyse durch HR mit Trypsin
Human	Aescin	3×10^{-6}	3×10^{-6}	$6,3 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-4}$
	Chlorpromazin	3×10^{-4}	3×10^{-4}	$4,7 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$
Ratte	Aescin	$2,5 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-6}$	$7,6 \times 10^{-4}$	6×10^{-4}
	SDS	10^{-4}	10^{-4}	$7,8 \times 10^{-3}$	$7,6 \times 10^{-3}$
Hund	Aescin	$2,1 \times 10^{-6}$	---	$4,5 \times 10^{-4}$	---
	SDS	10^{-4}	---	$7,2 \times 10^{-3}$	---

* alle Werte in Molar

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung von β -(Hydroxyäthyl)-rutosiden (HR) auf Hämolyse durch amphiphile Substanzen als Modell für eine Membranschädigung wurden von Biesen-dorfer et al. (1) untersucht und eine Schutzwirkung gegen Hämolyse gefunden. Der Mechanismus dieser Schutzwirkung sollte näher untersucht werden.

- 1) Die Bindung der amphiphilen Substanz Chlorpromazin an Erythrocyten wurde durch HR konzentrationsabhängig reduziert. Dies bedeutete entweder Verdrängung von der Bindungsstelle oder Inaktivierung in der Lösung.
- 2) Die Bildung von Aggregaten aus amphiphiler Substanz und HR wurde mittels Gelfiltration untersucht. Höhermolekulare Aggregate wurden für Chlorpromazin/HR und Natriumdeoxylat/HR nachgewiesen. Die Aggregatbildung erfolgte bei den gleichen Konzentrationen wie die, welche Schutz vor Hämolyse bewirken.
- 3) Trypsinbehandelte Erythrocyten, bei denen die Kohlehydratketten abgespalten sind, unterschieden sich bezüglich des HR-Schutzeffektes nicht von den unbehandelten.
Die Glykoproteine scheinen als „Receptoren“ für HR keine Rolle zu spielen.
- 4) Die antihämolytische HR-Wirkung ist speciesunabhängig. Ratten- bzw. Hunde-erythrocyten unterschieden sich in dieser Hinsicht nicht von menschlichen Erythrocyten.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Schutzeffekt von HR bei der durch amphiphile Substanzen ausgelösten Hämolyse auf einer Inaktivierung des Hämolsins beruht (chemischer Antagonismus).

LITERATURVERZEICHNIS

1. Biesendorfer, H., W. Felix, D.B. Wildenauer
Studies on the haemolytic action of amphiphilic substances in vitro.
Inhibition by O-(β -hydroxyethyl)-rutosides.
Biochem. Pharmacol. 30, 2287 - 2292 (1981)
2. Felix, W.
Zur Wirkung von O-(β -Hydroxyethyl)-rutosiden
auf die Ödembildung durch Äthoxysklerol und Thiopental
am Hinterlauf der Katze.
In: W. Voelter, G. Jung [Hrsg.], O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside -
experimentelle und klinische Ergebnisse. S. 93 - 102.
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1978
3. Felix, W.
Zum Problem „Venennittel“.
Med. Welt 31, 813 - 816 (1980)
4. Gábor, M.
Abriß der Pharmakologie von Flavonoiden
unter besonderer Berücksichtigung der antiödematösen und antiphlogistischen Effekte
(S. 13)
Ak. Kiadó (Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften), Budapest, 1975
5. Gábor, M., G. Blazsó
Effekt von Rutosiden auf das Rattenpfoten-Ödem.
In: Voelter-Jung, a.a.O., S. 73-78
6. Hammersen, F.
Zur Ultrastruktur experimenteller Ödeme
und deren Beeinflussung durch O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside.
In: Voelter-Jung, a.a.O., S. 103-120
7. Laemmli, U.K.
Cleavage of structural proteins
during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685 (1970)
8. Nieciecki, A. v.
Unveröffentlichte Ergebnisse

9. Seeman, Ph.
The membrane actions of anesthetics and tranquilizers.
Pharmacol.Rev. 24, 583-655 (1972)
10. Thoma, K., E.Vasters
Photoinstabilität und Stabilisierung von Phenothiazin.
Pharm.Ztg. 119, 1430-1435 (1974)
11. Voelter, W., G.Jung
Vorwort.
In: Voelter-Jung, a.a.O.

Die Versuche zu vorliegender Arbeit wurden am Pharmakologischen Institut (jetzt: Institut für Pharmakologie und Toxikologie) der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Felix danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und sein reges Interesse an der Arbeit, Herrn Dr. D. B. Wildenauer und dessen Mitarbeitern für Rat und Hilfe bei den Versuchen.

LEBENS LAUF

Am 11. Januar 1954 wurde ich als Sohn des Beamten Lewis Becker und seiner Ehefrau Marianne, geb. Durant, in München geboren.

In Wiesbaden, Hessen, besuchte ich die amerikanische Schule, wo ich 1972 mein Diplom erhielt. Danach bezog ich für zwei Jahre die University of Maryland. Im Wintersemester 1974 begann ich mit dem Studium der Zahnmedizin in München, das ich im Herbst 1980 erfolgreich beendete.

Von November 1980 bis Juni 1981 führte ich am Pharmakologischen Institut der Universität München meine Doktorarbeit durch.

